Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 249- 263

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۲۶۳-۲۴۹

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir
Full Research Paper

Effect of addition of bioactive peptide obtained from enzymatic hydrolysis of yogurt whey on qualitative properties of doogh

Nafiseh Karimi[1], Rezvan Pourahmad[2*], Salman Taheri [3], Orang Eyvazzadeh[4]

Received: 2021.06.10
Accepted: 2021.08.04

How to cite this article:
Karimi, N., Pourahmad, R., Taheri, S., Eyvazzadeh, O. (2022). Effect of addition of bioactive peptide obtained from enzymatic hydrolysis of yogurt whey on qualitative properties of doogh. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (2), 249-263.

Abstract

Introduction: Yogurt contains valuable compounds, some of which enter yogurt whey and if discarded, remains unused. Yogurt whey has a high nutritional value due to its high quality biological proteins which can be a good source of bioactive peptides. Bioactive peptides are food-derived peptides that are small in size and usually consist of 3- 20 amino acids. These peptides are considered as functional ingredients. Bioactive peptides have antioxidants and antimicrobial properties. The aim of this study was to investigate the effect of adding bioactive peptide derived from enzymatic hydrolysis of yogurt whey on physicochemical, sensory and microbial properties of doogh during storage.

Materials and Methods: In this study, peptide derived from tryptic hydrolysis of yogurt whey protein fractionated by RP- HPLC was used. Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum bactericidal concentration (MBC) of this peptide were determined against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. This peptide was incorporated to heated doogh at concentrations of 12, 20, 24, 40, 48, and 80 mg/mL. Moreover, doogh samples were inoculated with 10^6 CFU/mL *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Doogh samples were stored for two months. During 60 days storage, bacterial count, pH, acidity, ABTS radical cation inhibitory activity and sensory properties (taste, odor, texture, color and overall acceptance) of doogh samples were studied.

Results and Discussion: The MIC of yogurt whey peptide against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was 12.2 and 24.4 mg/mL, respectively. Moreover, the MBC of yogurt whey peptide against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was 12.2 and 48.8 mg/mL, respectively. Addition of this peptide to doogh showed that during storage period, the *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* counts, pH and ABTS cation radical inhibitory activity of the samples were significantly decreased, but acidity was increased ($p<0.05$). The peptide of yogurt whey showed good antioxidant and antibacterial activities in doogh samples. By increasing the level of peptide in samples, the ABTS cation radical inhibitory activity was significantly increased ($p<0.05$). During storage, the control sample (without bioactive peptide) showed the highest reduction in antioxidant activity and the lowest reduction was related to the sample containing 48.8 mg/mL bioactive peptide. The ABTS cation radical inhibitory activity of the control sample and sample containing 48.8 mg/mL bioactive peptide was 9.72 and 3.66 Unit/mL, respectively on the 60th day. By increasing the levels of bioactive peptide, pathogenic bacteria counts were decreased ($p<0.05$). The sample containing the highest level of peptide (48.8 mg/mL) was free of *Staphylococcus aureus* and *E. coli* on the 20th day of storage. The control sample and samples containing 12.2 and 24.4 mg/mL bioactive peptide were free of these pathogenic bacteria on the 60th and 40th days, respectively. The highest rate of acidity and pH changes was related to the control sample and sample containing 48.8 mg/mL bioactive peptide had the lowest changes during storage. The acidity of control sample and sample containing 48.8 mg/mL bioactive peptide was 0.68 and 0.56% lactic acid, respectively on the 60th day.The results of sensory evaluation showed that in the control sample and sample containing the lowest level of peptide (12.2

1, 2 and 4. Ph.D. Student, Professor and Assitant Professor , Department of Food Science and Technology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran, Respectively.
3. Assistant Professor, Chemistry and Chemical Engineering Research Center of Iran, Tehran, Iran.
(*Corresponding Author Email: rjpourahmad@yahoo.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.70916.1059

mg/mL), the score of sensory characteristics decreased during the storage period, however, the use of the highest level of yogurt whey peptide (48.8 mg/mL) in the doogh formulation was able to reduce the rate of loss of sensory properties and maintain product quality over time. The sample containing 48.8 mg/mL bioactive peptide had the highest score of overall acceptability. Finally, the concentration of 48.8 ppm peptide can be considered as the best level to enrich the doogh in terms of physicochemical, microbial and sensory properties. Therefore, it is concluded that bioactive peptide derived from yogurt whey can be used as a natural antioxidant and antimicrobial agent in fermented dairy products like doogh.

Keywords: Bioactive Peptide, Doogh, Antioxidant Activity, Antibacterial Effect, Shelf Life.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 249- 263

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۲۶۳-۲۴۹

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی اثر افزودن پپتید زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی آب ماست بر ویژگی‌های کیفی دوغ

نفیسه کریمی[۱]- رضوان پوراحمد[۲]*- سلمان طاهری[۳]- اورنگ عیوض‌زاده[٤]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۱۳

چکیده

هدف از این پژوهش، بررسی اثر افزودن پپتید زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی آب ماست بر ویژگی‌های کیفی دوغ بود. پپتید حاصل از هیدرولیز پروتئین آب ماست با تریپسین، که با استفاده از RP-HPLC تفکیک (جزء به جزء) شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. غلظت‌های مختلف این پپتید (۱۲/۲۰، ۲۴/۴ و ۴۸/۸ mg/mL) به دوغ اضافه گردید. به‌منظور بررسی اثر ضدمیکروبی این پپتید، تراکم 10^6 CFU/mL از باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* به دوغ تلقیح شد. طی ۶۰ روز نگهداری، شمارش باکتریایی (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی*)، pH، اسیدیته، مهار رادیکال کاتیون ABTS (2, 2′-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) و خواص حسی نمونه‌های دوغ ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که طی دوره نگهداری، تعداد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* ، مقادیر pH و مهار رادیکال کاتیون ABTS در کلیه نمونه‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<0.05$)، ولی اسیدیته افزایش پیدا کرد. پپتید حاصل از آب ماست فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی خوبی در نمونه‌های دوغ نشان داد، به‌طوری که با افزایش سطح پپتید در نمونه‌ها، مهار رادیکال به‌طور معنی‌داری افزایش و شمارش باکتری‌های بیماری‌زا کاهش یافت ($p<0.05$). تیمار حاوی بالاترین سطح پپتید (۴۸/۸ mg/mL) در روز بیستم انبارمانی، فاقد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* بود. نتایج ارزیابی حسی نشان داد که در نمونه شاهد (فاقد پپتید زیست فعال) و نمونه حاوی پایین‌ترین سطح پپتید (۱۲/۲۰ mg/mL)، امتیاز ویژگی‌های حسی طی دوره نگهداری کاهش یافت، ولی استفاده از بالاترین سطح پپتید آب ماست در فرمولاسیون دوغ توانست سرعت اُفت ویژگی‌های حسی را طی دوره نگهداری کاهش داده و کیفیت محصول را حفظ نماید. بر طبق نتایج حاصله، غلظت ۴۸/۸ mg/mL پپتید را می‌توان به‌عنوان بهترین سطح جهت غنی‌سازی دوغ انتخاب کرد. بنابراین پپتید حاصل از هیدرولیز آنزیمی آب ماست می‌تواند به عنوان عامل آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی طبیعی در محصولات لبنی مانند دوغ مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: پپتید زیست‌فعال، دوغ، فعالیت آنتی اکسیدانی، اثر ضدباکتریایی، دوره نگهداری

مقدمه

پپتیدهای زیست‌فعال، توالی‌های خاصی از اسیدهای آمینه هستند و تا زمانی که متصل به سایر اسیدهای آمینه موجود در ساختار اولیه پروتئین باشند، به‌صورت غیرفعال باقی می‌مانند (Harnedy and FitzGerald, 2012). پپتیدهای زیست‌فعال علاوه بر ارزش تغذیه‌ای از لحاظ در اختیار گذاشتن اسیدهای آمینه، تأثیر فیزیولوژیکی در بدن انسان دارند، بنابراین به‌عنوان ترکیبات عملگرا یا فراسودمند نیز در نظر گرفته می‌شوند (Sampath Kumar *et al.*, 2011). این پپتیدهای فعال زیستی که معمولاً از ۲۰- ۲ اسید آمینه تشکیل شده‌اند، تا زمانی که توسط آنزیم و یا طی فرآیند تخمیر آزاد نگردند، غیرفعال هستند. شکل آزاد شده این پپتیدها، به دلیل دارا بودن خصوصیات زیست‌فعالی، دارای فعالیت‌های فیزیولوژیکی مختلف نظیر تحریک ایمنی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، کاهش‌دهنده فشار خون، فعالیت ضدمیکروبی و کاهش‌دهنده کلسترول خون می‌باشند (Agyei and Danquah, 2012; Tang *et al.*, 2015; Athmani *et al.*, 2015).

امروزه، پپتیدهای ضدمیکروبی به‌عنوان نگهدارنده‌های غذایی ایمن مورد توجه می‌باشند که از آلودگی و فساد مواد غذایی جلوگیری کرده و از آن‌ها در مقابل بیماری‌های مرتبط با غذا محافظت می‌کنند (Shayesteh *et al.*, 2014).چندین نوع پپتید زیست‌فعال (تا ۱۰۰ اسید آمینه) با مشخصات کاتیونی و آب‌گریزی، که دارای فعالیت ضدمیکروبی مؤثر در برابر تعداد زیادی از میکروب‌ها نظیر باکتری‌های

۱، ۲ و ۴- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استاد و استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.
۳- استادیار، پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران، تهران، ایران.
(* - نویسنده مسئول: Email: rjpourahmad@yahoo.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.70916.1059

گرم‌مثبت و گرم‌منفی، قارچ‌ها، ویروس و پارازیت‌ها هستند، در مطالعات علمی مختلف نشان داده شده‌اند (Hancock and Sahl, 2006) و تاکنون برخی از انواع پپتیدهای ضدمیکروبی از کازئین و پروتئین‌های سرمی شیر حاصل شده‌اند.

اولین پپتید ضدمیکروبی Casecidin-1 است که از طریق هیدرولیز آنزیمی αS_1 کازئین با تریپسین به‌دست می‌آید، از اسیدآمینه ۱۵۰ تا ۱۸۸ را شامل می‌شود، و از رشد *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* ممانعت می‌کند. کاپا کازسیدین از دیگر پپتیدهای مشتق از هیدرولیز کاپا کازئین به‌وسیله تریپسین است. این پپتید شامل ۲۱- ۱۷ اسید آمینه است و فعالیت ضدمیکروبی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پیوژنز، لیستریا مونوسیتوژنز و کاندیدا آلبیکانس* نشان می‌دهد (Korhonen and Marnila, 2013). علاوه بر این، گزارش شده است که پپتیدهای به‌دست آمده از پروتئین‌های هیدرولیز شده، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشابه با آنتی اکسیدان‌های سنتزی هستند. از این پپتیدها می‌توان در تولید مواد غذایی ایمن استفاده نمود (Mora *et al*., 2014 Rao *et al*., 2012 a,b;). نحوه عملکرد پپتیدهای دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌طور کامل مشخص نشده است، ولی بسیاری از محققان اظهار داشتند که پپتیدها می‌توانند از اکسیداسیون لیپیدها جلوگیری کنند (Sakanaka *et al*., 2004)، رادیکال‌های آزاد را دفع نمایند (Gómez-Guillén *et al*., 2010)، با یون‌های فلزی تشکیل کمپلکس دهند (Alemán *et al*., 2011) و مولکول‌های اکسیژن فعال را خنثی کنند (Zhuang & Sun, 2011). خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پپتیدها در ارتباط با ترکیب، ساختار شیمیایی و خاصیت آب‌گریزی آن‌ها می‌باشد (Chen *et al*., 1998).

دوغ، نوشیدنی حاصل از تخمیر لاکتیکی شیر است که به علت pH پایین و غنی بودن از مواد مغذی، به‌خصوص در دمای محیط، مستعد آلودگی با کپک‌ها و مخمرها و بعضی از باکتری‌ها می‌باشد، که موجب تغییر طعم و عطر محصول و بادکردگی آن در طول زمان نگهداری می‌شود (Salminen *et al*., 2004). این موضوع به‌عنوان یک چالش مهم در صنعت شیر مطرح است؛ بنابراین استفاده از مواد طبیعی و ضدمیکروبی مناسب برای حفظ کیفیت و افزایش ماندگاری دوغ، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

هدف از این تحقیق، بررسی تأثیر افزودن سطوح مختلف پپتید زیست‌فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی آب ماست بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی، حسی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ماندگاری میکروبی دوغ (به‌عنوان یک مدل غذایی) است.

مواد و روش‌ها

جداسازی پپتید زیست فعال از آب ماست

آب ماست از ماست چکیده حاصل از شرکت طراوت (ورامین، ایران) تهیه گردید. برای جداسازی پروتئین آب ماست، pH آب ماست به‌وسیله سود ۰/۱ مولار بر روی ۹ تنظیم شد. پس از ته‌نشینی پروتئین، آب ماست تحت سانتریفوژ با دور ۱۵۰۰۰×g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. سپس پروتئین آب ماست توسط آنزیم تریپسین (Merck, Germany) در دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد و زمان ۲۴۰ دقیقه هیدرولیز شد. هیدرولیزات (آبکافته) تولید شده، طبق روش Salami و همکاران (۲۰۰۸) بر اساس وزن مولکولی توسط غشاهای اولترافیلتر سانتریفوژی که اندازه منافذ آن‌ها به‌ترتیب از بزرگ به کوچک ۱۰، ۵ و ۳ کیلودالتون بود، جداسازی شد. فراکسیون‌های هیدرولیزات (آبکافته) از نظر خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی بررسی شدند و با توجه به بررسی نتایج حاصله در این مرحله، فراکسیون با محدوده وزن مولکولی ۱۰-۵ kDa به‌عنوان تیمار برتر انتخاب شد. سپس تفکیک (جزء به جزء سازی) فراکسیون‌های پپتیدی طبق روش Asoodeh و همکاران (۲۰۱۲)، با استفاده از RP-HPLC (Knauer, Germany) بر روی ستون آنالیتیکی C18 انجام گرفت. فراکسیون‌های پپتیدی از نظر خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی بررسی شدند و با توجه به بررسی نتایج حاصله، پپتید زیست فعال با بالاترین خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی جهت افزودن به دوغ انتخاب گردید.

آماده‌سازی دوغ

جهت تولید دوغ، شیر ۱/۵ درصد چربی در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه پاستوریزه شد. سپس تا دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد سرد شده و در این دما، استارتر ماست (*استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتو باسیلوس دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس*) به شیر پاستوریزه اضافه گردید. گرمخانه‌گذاری در دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به اسیدیته ۱۲۰ درجه دورنیک صورت گرفت و سپس به ماست تولید شده مقدار ۵۰ درصد آب و ۰/۷ درصد نمک اضافه شد. در مرحله بعد، محصول در دمای ۷۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه پاستوریزه شد و سپس سرد کردن تا دمای ۱۳ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت (Anonymous, 2008). دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC 1112 و *اشریشیا کلی* PTCC 1330 هریک به میزان 10^6CFU/mL اضافه شده و سپس ۳ غلظت مختلف پپتید زیست‌فعال (این غلظت‌ها پس از تعیین MIC مشخص شدند) به دوغ اضافه گردیدند. نمونه شاهد بدون افزودن پپتید زیست فعال در نظر گرفته شد. آزمون‌های میکروبی در روزهای صفر، ۲۰، ۴۰، ۶۰ بر روی

نمونه‌های دوغ انجام گرفت. همچنین آزمون‌های فیزیکوشیمیایی و حسی در نمونه‌های دوغ فاقد باکتری‌های بیماریزا، در روزهای مذکور انجام پذیرفت.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)[1] و حداقل غلظت کشندگی (MBC)[2]

جهت تعیین MIC از روش میکرودایلوشن[3] استفاده شد. محیط کشت مورد استفاده مولر هینتون براث بود. در این روش از پلیت‌های ۹۶ چاهکی استفاده گردید و در هر چاهک غلظت مختلف پپتید به همراه سوسپانسیون میکروبی اضافه شده و پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از ۴۸ ساعت رشد یا عدم رشد در چاهک از طریق اندازه‌گیری جذب نور در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی شد.

از چاهک‌هایی که عدم رشد را نشان دادند، در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند. پلیت‌های مربوط به چاهک‌هایی که حاوی کمترین غلظت پپتید بوده و در آن رشد باکتری مشاهده نشد، به عنوان MBC در نظر گرفته شد (Saei-Dehkordi *et al.*, 2010).

شمارش میکروبی

شمارش باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* طبق استاندارد ایران شماره ۳-۶۸۰۶ در محیط برد پارکر آگاربا روش کشت سطحی انجام گرفت. گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۴۸ ساعت صورت گرفت (Anonymous, 2006b). شمارش *اشریشیا کلی* در محیط کشت ویولت رد بایل آگار[4] با روش پورپلیت انجام شد. گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۲۴ ساعت صورت گرفت (Ahmadi *et al.*, 2018).

اندازه‌گیری pH و اسیدیته

برای اندازه‌گیری pH و اسیدیته از روش استاندارد ملی به شماره ۲۸۵۲ استفاده شد (Anonymous, 2006a).

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی (فعالیت مهار رادیکال کاتیونی ABTS)

برای این منظور، ابتدا یک محلول ۷ مولار ABTS در آب مقطر تهیه گردید. سپس این محلول توسط پرسولفات پتاسیم، اکسید شده سپس به مدت ۱۶- ۱۲ ساعت در تاریکی قرار داده شد. بعد از گذشت این زمان، محلول رادیکال کاتیون به‌دست آمده به‌وسیله اتانول خالص، ۵۰ بار رقیق و سپس از آن استفاده گردید. به این ترتیب که در هریک از لوله‌های آزمایش آماده شده، ۱ میلی‌لیتر از این محلول ریخته شد و سپس ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه آنتی‌اکسیدان به آن‌ها اضافه گردید، بعد از گذشت ۱۵ دقیقه جذب آن‌ها در طول موج ۷۳۴ نانومتر (Uniko ،Uv/Vis 2100، آمریکا) خوانده شد. همچنین به یکی از لوله‌های آزمایش نیز به جای نمونه، اتانول اضافه شد (به‌عنوان کنترل) و جذب آن در لحظه اول و نیز بعد از گذشت ۱۵ دقیقه قرائت گردید. سپس درصد بازدارندگی نمونه‌ها از طریق رابطه زیر محاسبه ودر نهایت به صورت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل اسید اسکوربیک گزارش شد (Miliauskas *et al.*, 2004).

$$\%I = [(A_{b(15)} - A_{s(15)}) / A_{b(15)}] \times 100 \qquad (۱)$$

$A_{b(15)}$: میزان جذب شاهد بعد از ۱۵ دقیقه

$A_{s(15)}$: میزان جذب نمونه بعد از ۱۵ دقیقه

%I: درصد بازدارندگی

ارزیابی حسی

ویژگی‌های حسی (مزه، بو، رنگ، بافت و پذیرش کلی) بر اساس روش استاندارد ملی شماره ۲۴۵۳در چارچوب آزمون هدونیک ۵ نقطه‌ای توسط ۷ ارزیاب آموزش‌دیده بررسی شد. نمونه‌های دوغ به طور تصادفی کدگذاری شده و سپس ارزیاب‌ها نمونه‌ها را بررسی کردند، که در ارزیابی حسی شماره ۱ نشان‌دهنده کمترین امتیاز و شماره ۵ نمایانگر بیشترین امتیاز برای هر صفت مورد ارزیابی بود (Anonymous, 2008).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها، از آزمون تجزیه واریانس (ANOVA) در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل در ۳ تکرار استفاده شد و تجزیه داده‌ها به‌وسیله نرم‌افزار SPSS 22.0 صورت گرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها، از روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده گردید (p<۰/۰۵) و نمودارهای مربوطه با نرم افزار اکسل ۲۰۱۳ رسم شدند.

نتایج و بحث

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) پپتید حاصل از آب ماست

مقادیر MIC پپتید زیست فعال حاصل از آب ماست در مقابل *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* به‌ترتیب ۱۲/۲۰ mg/mL و

1 Minmum Inhibitory Concentration
2 Minimum Bactericidal Concentration
3 Microdilution
4 Violet Red Bile Agar (VRBA)

۲۴/۴۰mg/mL بود. MBC پپتید زیست فعال حاصل از آب ماست در مقابل *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* به‌ترتیب ۱۲/۲۰ و ۴۸/ ۸۳mg/mL بود.

فعالیت ضدباکتریایی پپتید زیست فعال

فعالیت ضدباکتریایی پپتید زیست فعال حاصل از آب ماست در مقابل *اشریشیا کلی* در دوغ در جدول ۱ مشخص گردیده است. در روز اول تولید، بیشترین تعداد *اشریشیا کلی* در تیمار شاهد (فاقد پپتید زیست فعال) یافت شد (۵/۹۲Log CFU/mL) و با افزودن پپتید آب ماست و افزایش سطح آن‌ها، شمارش این باکتری گرم‌منفی در دوغ‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافت (p<۰/۰۵)، به‌طوری که کمترین تعداد *اشریشیا کلی* در این روز مربوط به تیمار حاوی mg/mL ۴۸/۸ پپتید بود (۴/۱۰Log CFU/mL). طی دوره نگهداری، شمارش *اشریشیا کلی* در کلیه تیمارها به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد (p<۰/۰۵)، به‌طوری که در تیمار شاهد در روز شصتم، در تیمارهای حاوی سطوح ۱۲/۲۰ و ۲۴/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پپتید در روز چهلم و در تیمار حاوی سطوح mg/mL ۴۸/۸ پپتید در روز بیستم انبارمانی، *اشریشیا کلی* یافت نشد. فعالیت ضدباکتریایی پپتید زیست فعال حاصل از آب ماست در مقابل *استافیلوکوکوس اورئوس* در دوغ در جدول ۲ مشخص گردیده است.

در روز اول تولید، نمونه شاهد بیشترین تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* را داشت (۵/۸۶Log CFU/mL) و افزودن پپتید آب ماست و افزایش سطح آن‌ها در نمونه‌های دوغ، منجر به کاهش معنی‌دار تعداد این باکتری در تیمارهای تولیدی گردید (p<۰/۰۵). کمترین تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* در روز اول انبارمانی مربوط به تیمار حاوی mg/mL ۴۸/۸ پپتید بود (۳/۸۵Log CFU/mL). طی دوره نگهداری ۶۰ روزه، تعداد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در کلیه تیمارهای دوغ به طور معنی‌داری کاهش یافت (p<۰/۰۵)، به‌طوری که در تیمار شاهد و تیمار حاوی mg/mL ۱۲/۲۰ در روز شصتم، در تیمار حاوی سطح mg/mL ۲۴/۴ پپتید در روز چهلم و در تیمار حاوی سطح mg/mL ۴۸/۸ پپتید در روز بیستم انبارمانی، *استافیلوکوکوس اورئوس* یافت نشد.

محققین کاهش شمارش میکروارگانیسم‌های پاتوژن غذایی نظیر *اشریشیا کلی* در نمونه‌های ماست طی دوره انبارمانی در یخچال طی ۱۳ روز را تا حد غیرقابل تشخیص، به حضور شرایط استرس اسیدی در محصولات لبنی تخمیری نسبت دادند (Bachrouri *et al.*, 2002). به‌طور کلی، نگهدارنده‌های طبیعی، میزان pH و شرایط زیست‌محیطی نامطلوب، بر رشد میکروارگانیسم‌ها در فرآورده‌های لبنی تخمیر شده تأثیر می‌گذارند (Adebayo *et al.*, 2014).

اکثر پپتیدهای فعال ضدمیکروبی می‌توانند بـه غشای میکروبی نفوذ کرده و سبب تخریب آن شوند و یا از غشاء سلولی عبور کرده و اثر خود را بر سلول‌های هدف اعمال نمایند (Sah *et al.*, 2016). Taha و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی خواص عملگرایی پپتیدهای زیست‌فعال ماست تهیه شده از شیر بوفالو نشان دادند که طی دوره نگهداری، در اثر فعالیت باکتری‌های استارتر در ماست، میزان پپتیدهای زیست‌فعال افزایش می‌یابد که این پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از ماست دارای فعالیت ضدباکتریایی خوبی در مقابل باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* هستند.

جدول ۱- شمارش *اشریشیا کلی* (Log CFU/mL) در نمونه‌های دوغ طی دوره نگهداری

Table 1- ***Escherichia coli*** **count in doogh samples during storage**

تیمارها Treatment	زمان نگهداری During Storage 1	20	40	60
دوغ شاهد (فاقد پپتید) Control sample	5.92± 0.03 ^{A,a}	4.48± 0.05 ^{B,a}	1.46± 0.15 ^{C,a}	0.00± 0.00 ^{D,a}
دوغ حاوی ۱۲/۲ mg/mL پپتید Doogh containing 12.2 mg/mL peptide	5.48± 0.05 ^{A,b}	2.77± 0.12 ^{B,b}	0.00± 0.00 ^{C,b}	0.00± 0.00 ^{C,a}
دوغ حاوی ٢٤/٤ mg/mL پپتید Doogh containing 24.4 mg/mL peptide	5.00± 0.05 ^{A,c}	1.80± 0.04 ^{B,c}	0.00± 0.00 ^{C,b}	0.00± 0.00 ^{C,a}
دوغ حاوی ٤٨/٨ mg/mL پپتید Doogh containing 48.8 mg/mL peptide	4.10± 0.17 ^{A,d}	0.00± 0.00 ^{B,d}	0.00± 0.00 ^{B,b}	0.00± 0.00 ^{B,a}

*وجود حداقل یک حرف لاتین بزرگ مشابه در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.

*وجود حداقل یک حرف لاتین کوچک مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.

جدول ۲- شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* (Log CFU/mL) در نمونه‌های دوغ طی دوره نگهداری

Table 2- *Staphylococcus aureus* count in doogh samples during storage

تیمارها Treatment	زمان نگهداری During Storage 1	20	40	60
دوغ شاهد (فاقد پپتید) Control sample	5.86± 0.09 ^{A,a}	3.46± 0.15 ^{B,a}	1.69± 0.09 ^{C,a}	0.00± 0.00 ^{D,a}
دوغ حاوی ۱۲/۲ mg/mL پپتید Doogh containing 12.2 mg/mL peptide	5.40± 0.17 ^{A,b}	2.63± 0.06 ^{B,b}	0.36± 0.10 ^{C,b}	0.00± 0.00 ^{D,a}
دوغ حاوی ٢٤/٤ mg/mL پپتید Doogh containing 24.4 mg/mL peptide	4.77± 0.07 ^{A,c}	1.84± 0.06 ^{B,c}	0.00± 0.00 ^{C,c}	0.00± 0.00 ^{C,a}
دوغ حاوی ٤٨/٨ mg/mL پپتید Doogh containing 48.8 mg/mL peptide	3.85± 0.13 ^{A,d}	0.00± 0.00 ^{B,d}	0.00± 0.00 ^{B,c}	0.00± 0.00 ^{B,a}

*وجود حداقل یک حرف لاتین بزرگ مشابه در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.

*وجود حداقل یک حرف لاتین کوچک مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.

pH و اسیدیته نمونه‌های دوغ

با توجه به شکل ۱، در روز اول تولید، بین مقادیر pH تیمارهای حاوی سطوح مختلف پپتید زیست‌فعال از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (p>۰/۰۵). طی دوره نگهداری ۶۰ روزه، pH تمام تیمارها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (p<۰/۰۵). بیشترین تغییرات pH طی دوره نگهداری مربوط به شاهد بود و تیمار حاوی بالاترین سطح پپتید (۴۸/۸ mg/mL)، تغییرات کمتری را داشت. به طوری که کمترین pH در روز آخر انبارمانی مربوط به تیمار شاهد بود (۴/۰۸) و تیمار حاوی ۴۸/۸ mg/mL پپتید بیشترین pH را داشت (۴/۲۳).

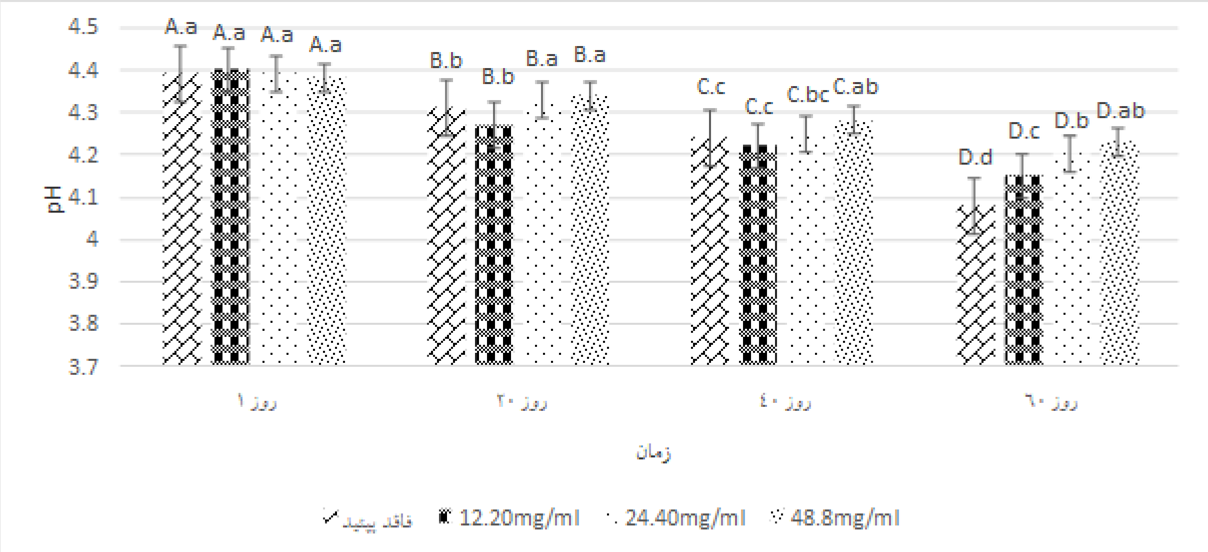
با توجه به شکل ۲، در روز اول تولید، بین مقادیر اسیدیته نمونه شاهد و تیمارهای حاوی سطوح مختلف پپتیدهای زیست‌فعال از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (p>۰/۰۵). طی دوره نگهداری ۶۰ روزه، مقادیر اسیدیته قابل تیتراسیون کلیه تیمارهای دوغ به طور معنی‌داری افزایش یافت (p<۰/۰۵). بیشترین تغییرات اسیدیته طی دوره نگهداری مربوط به شاهد بود و تیمار حاوی بالاترین سطح پپتید (۴۸/۸ mg/mL)، تغییرات کمتری را داشت. تا روز ۴۰ انبارمانی، بین مقادیر اسیدیته نمونه شاهد و تیمار حاوی ۱۲/۲۰ mg/mL پپتید از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. در روز آخر انبارمانی، بیشترین میزان اسیدیته مربوط به تیمار شاهد بود (۰/۶۸ درصد بر حسب اسید لاکتیک) و تیمار حاوی سطح ۴۸/۸ mg/mL پپتید کمترین میزان را داشت (۰/۵۶ درصد بر حسب اسید لاکتیک).

کاهش pH تیمارهای مختلف دوغ طی دوره نگهداری می‌تواند به‌دلیل مصرف کربوهیدرات باقی‌مانده (لاکتوز) به‌وسیله باکتری‌های لاکتیک و تولید اسید لاکتیک، مقداری کمی دی‌اکسید کربن و اسید فرمیک باشد (Singh *et al.*, Panesar and Shinde, 2011; 2011). همچنین گزارش شده است که کاهش pH می‌تواند به علت فرآیند پس‌اسیدی‌سازی[1] در طول نگهداری به دلیل فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز باشد، که در دماهای صفر تا پنج درجه سانتی‌گراد می‌تواند فعال باقی بماند (Kailasapathy, 2006). برخی محققین کاهش pH را به دلیل حضور آنزیم‌های باقی مانده از فعالیت باکتری‌های استارتر در حین فرآیند تخمیر نسبت می‌دهند (Christopher et al., 2009). پپتید حاصل از پروتئین‌های آب ماست، به دلیل دارا بودن فعالیت ضدمیکروبی، رشد میکروارگانیسم‌ها در تیمارهای دوغ را کاهش داده و از این طریق، سبب کاهش سرعت تغییرات pH نسبت به تیمار شاهد گردید.

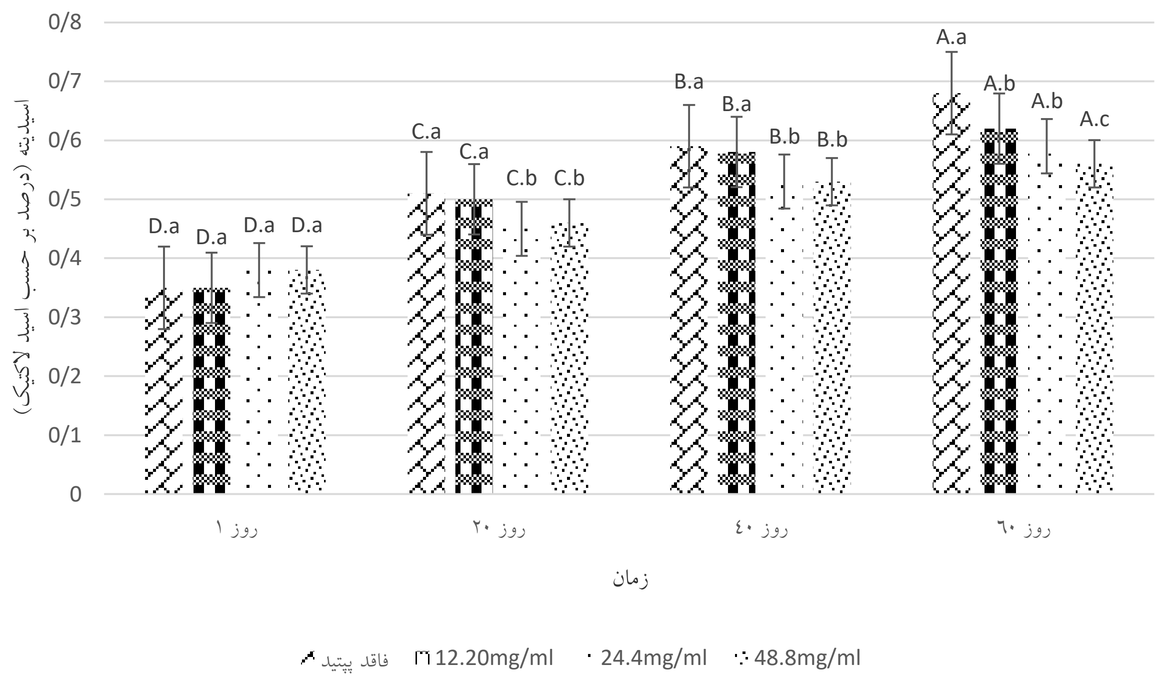
در تحقیق صورت گرفته توسط Ma و همکاران (۲۰۱۹) مشاهده گردید که افزودن هیدرولیزات‌های حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های کازئین، ژلاتین ماهی و گاوی توسط آنزیم کاتالاز به فرمولاسیون ماست قالبی پس‌چرخ تغییر معنی‌داری را در pH و اسیدیته تیمارهای ماست ایجاد نکرد. طی دوره تخمیر ۵ ساعته، مقادیر pH کلیه تیمارها به‌طور قابل توجهی کاهش و اسیدیته افزایش یافت، ولی کاهش pH و افزایش اسیدیته در تیمار حاوی هیدولیزات کازئین بیشتر از نمونه شاهد و در تیمارهای حاوی هیدرولیزات‌های ژلاتین ماهی و گاوی به طور معنی‌داری کمتر از شاهد بود (Ma et al., 2019). Won و همکاران (۲۰۱۷) نیز کاهش pH و افزایش اسیدیته در تیمارهای ماست شاهد و حاوی پپتیدهای حاصل از

1 Postacidification

پروتئین آب‌پنیر طی دوره تخمیـر را مشـاهده نمودنـد (Won et al., 2017).



شکل ۱- مقادیر pH نمونه‌های دوغ طی دوره نگهداری
Fig. 1. pH values of doogh samples during storage



شکل ۲- مقادیر اسیدیته (درصد بر حسب اسید لاکتیک) نمونه‌های دوغ طی دوره نگهداری
Fig. 2. Acidity values (percentage in terms of lactic acid) of doogh samples during storage

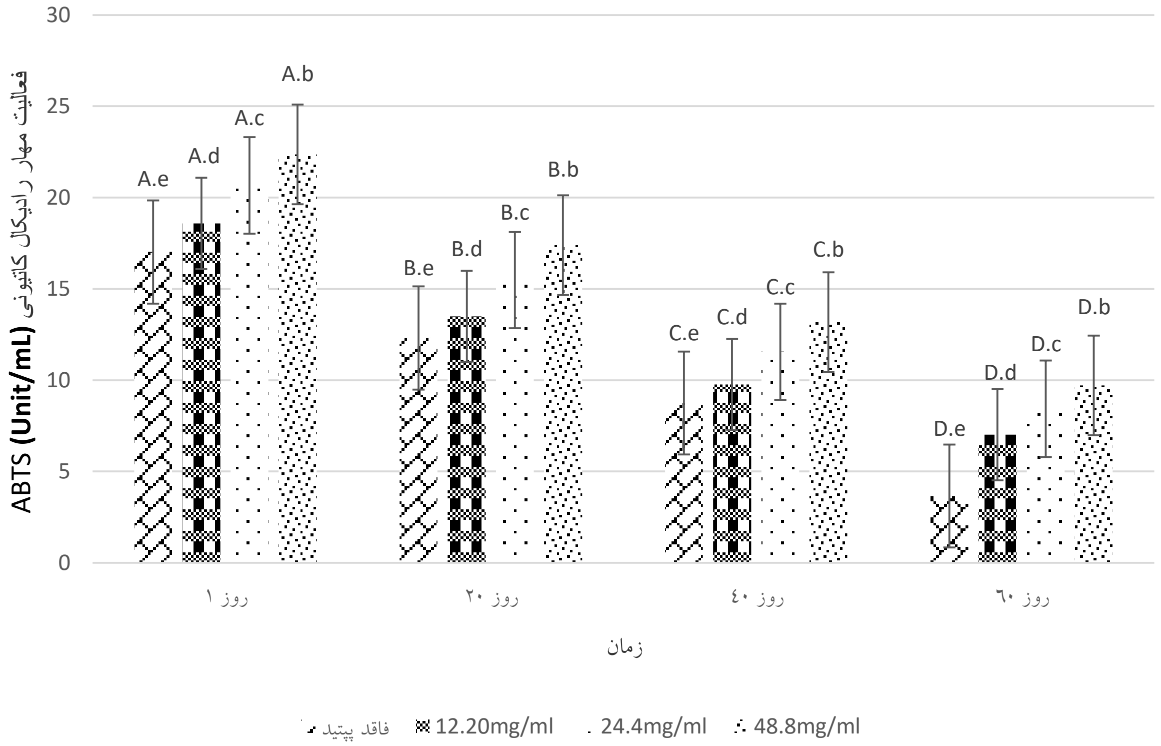
فعالیت مهار رادیکال کاتیونی ABTS نمونه‌های دوغ

در روز اول تولید، با افزایش سطح پپتید زیست فعال حاصل از آب ماست، فعالیت مهارکنندگی رادیکالی نمونه‌های دوغ تولیـدی بـه‌طـور معنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$)، به‌طوری که در این روز بیشترین و کمترین میزان فعالیت مهـار رادیکـال کـاتیونی ABTS بـه‌ترتیـب مربوط به تیمار حاوی بالاترین سطح پپتید (۲۲/۳۶Unit/mL) و تیمار

شاهد (۱۷/۰۲Unit/mL) بود. در تمامی روزها نیز این روند معنی‌داری بین تیمارها مشاهده گردید. طی دوره نگهداری ۶۰ روزه، فعالیت آنتی اکسیدانی کلیه تیمارهای دوغ به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (p<۰/۰۵) و بیشترین شدت کاهش آن مربوط به تیمار شاهد بود. در روز آخر انبارمانی نیز بالاترین فعالیت مهارکنندگی رادیکالی در تیمار حاوی ۴۸/۸ mg/mL پپتید مشاهده گردید (۹/۷۲ Unit/mL) و کمترین میزان آن مربوط به نمونه شاهد بود (۳/۶۶ Unit/mL) (شکل ۳).

به‌طور کلی، فعالیت‌های زیستی و عملگرایی در هیدرولیزات‌های پروتئینی به‌طور زیادی وابسته به نوع آنزیم به‌کار رفته، سوبسترای پروتئینی و شرایط هیدرولیز دارد. با این حال، پروتئولیز آنزیمی غالباً سبب آزادسازی پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین شده و تعداد گروه‌های قابل یونیزه شدن را افزایش داده و گروه‌های آب‌گریز پنهان شده را در معرض قرار می‌دهد و از طریق فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد (Sarmadi and Ismail, 2010).

در تحقیق انجام شده توسط Kumar و همکاران (۲۰۱۶)، تأثیر سطوح مختلف هیدرولیزات‌های پروتئین شیر شتر بر خواص آنتی‌اکسیدانی امولسیون گوشت بز مورد بررسی قرار گرفته و نتایج حاصله نشان داد که طی دوره انبارمانی ۶ روزه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کلیه تیمارها کاهش یافت (Kumar et al., 2016). با افزایش سطوح هیدرولیزات‌های مورد استفاده، فعالیت مهار رادیکال کاتیونی ABTS به تدریج افزایش یافت، ولی میزان آن همواره کمتر از امولسیون حاوی آنتی اکسیدان سنتزی BHT بود. با این حال، فعالیت احیاکنندگی FRAP و مهار رادیکال آزاد DPPH تیمار حاوی سطح ۰/۰۶ درصد هیدرولیزات کازئین شیر شتر مشابه با تیمار حاوی آنتی‌اکسیدان سنتزی گزارش شد.



شکل ۳- فعالیت مهار رادیکال کاتیونی ABTS (Unit/mL) نمونه‌های دوغ طی دوره نگهداری
Fig. 3. ABTS cation radical inhibitory activity (Unit/mL) of doogh samples during storage

ویژگی‌های حسی نمونه‌های دوغ

از روز ۲۰ تا ۶۰ نگهداری، میانگین امتیازات بافت کلیه تیمارها به تدریج کاهش یافت (p<۰/۰۵). در روز آخر انبارمانی، نمونه شاهد دارای کمترین امتیاز بافت بود (۳/۴۳) و بین بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (p>۰/۰۵) (جدول ۳). در روز اول تولید، بالاترین امتیاز مزه مربوط به نمونه شاهد (۴/۸۶) و تیمار حاوی سطح ۱۲/۲۰ mg/mL پپتید (۵/۰۰) بود و با افزایش سطح پپتید در فرمولاسیون دوغ، امتیاز مزه کاهش یافت. در تیمار شاهد و تیمار حاوی ۱۲/۲۰ mg/mL پپتید، با گذشت زمان از روز اول تا ۶۰ نگهداری، میانگین امتیازات مزه به طور معنی‌داری کاهش یافت (p<۰/۰۵)، ولی در تیمارهای حاوی سطوح بالاتر پپتید زیست‌فعال آب ماست، طی دوره نگهداری تغییر معنی‌داری در امتیاز مزه مشاهده

نگردید ($p>0.05$). در روز آخر انبارمانی، بالاترین امتیاز مزه مربوط به تیمار حاوی ۲۴/۴ و ۴۸/۸ mg/mL پپتید بود (به‌ترتیب؛ ۴/۰۰ و ۳/۸۶) و تیمار شاهد کمترین امتیاز مزه را داشتند (۳/۰۰) (جدول ۴).

در روز اول و بیستم نگهداری، بین میانگین امتیازات رنگ نمونه شاهد و تیمارهای حاوی سطوح مختلف پپتیدهای زیست‌فعال از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($p>0.05$). از روز ۲۰ تا ۶۰ نگهداری، امتیازات رنگ اکثر تیمارها به تدریج کاهش یافت که البته معنی‌دار نبود ($p>0.05$). در روز آخر انبارمانی، تیمار حاوی ۴۸/۸ mg/mL پپتید دارای بالاترین امتیاز رنگ بود (۴/۴۳) و بین امتیازرنگ این تیمار و تیمارهای حاوی سطوح ۲۴/۴ mg/mL و ۱۲/۲۰ از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p>0.05$) (جدول ۵).

در روز اول تولید، بین میانگین امتیازات بوی نمونه شاهد و تیمارهای حاوی سطوح مختلف پپتیدهای زیست‌فعال از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. در روز آخر انبارمانی، تیمار شاهد کمترین امتیاز بو را کسب کرد (۳/۰۰). در این روز بالاترین امتیاز بو مربوط به تیمارهای حاوی سطوح ۲۴/۴ mg/mL و ۴۸/۸ پپتید بود (۴/۰۰). امتیاز بوی تیمارها طی دوره نگهداری کاهش یافت ($p<0.05$) که البته این کاهش در تیمار شاهد بیشتر بود (جدول ۶).

جدول ۳- امتیازات بافت نمونه‌های دوغ طی دوره نگهداری
Table 3- Texture scores of doogh samples during storage

تیمارها Treatment	زمان نگهداری During Storage 1	20	40	60
دوغ شاهد (فاقد پپتید) Control sample	5.00± 0.00 ^{A,a}	5.00± 0.00 ^{A,a}	4.00± 0.00 ^{B,c}	3.43± 0.27 ^{C,c}
دوغ حاوی ۱۲/۲ mg/mL پپتید Doogh containing 12.2 mg/mL peptide	5.00± 0.00 ^{A,a}	5.00± 0.00 ^{A,a}	4.71± 0.24 ^{B,ab}	4.14± 0.18 ^{C,ab}
دوغ حاوی ۲٤/٤ mg/mL پپتید Doogh containing 24.4 mg/mL peptide	5.00± 0.00 ^{A,a}	5.00± 0.00 ^{A,a}	4.14± 0.34 ^{AB,bc}	4.00± 0.00 ^{B,b}
دوغ حاوی ٤٨/٨ mg/mL پپتید Doogh containing 48.8 mg/mL peptide	5.00± 0.00 ^{A,a}	5.00± 0.00 ^{A,a}	4.57± 0.28 ^{B,ab}	4.14± 0.18 ^{B,ab}

*وجود حداقل یک حرف لاتین بزرگ مشابه در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.
*وجود حداقل یک حرف لاتین کوچک مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.

جدول ٤- امتیازات مزه نمونه‌های دوغ طی دوره نگهداری
Table 4- Taste scores of doogh samples during storage

تیمارها Treatment	زمان نگهداری During Storage 1	20	40	60
دوغ شاهد (فاقد پپتید) Control sample	4.86± 0.18 ^{A,a}	4.29± 0.24 ^{B,a}	3.43± 0.18 ^{C,b}	3.00± 0.00 ^{D,c}
دوغ حاوی ۱۲/۲ mg/mL پپتید Doogh containing 12.2 mg/mL peptide	5.00± 0.00 ^{A,a}	4.43± 0.28 ^{B,a}	4.14± 0.18 ^{B,a}	3.57± 0.28 ^{C,b}
دوغ حاوی ٢٤/٤ mg/mL پپتید Doogh containing 24.4 mg/mL peptide	4.14± 0.18 ^{A,b}	4.14± 0.18 ^{A,ab}	4.00± 0.00 ^{A,a}	4.00± 0.00 ^{A,a}
دوغ حاوی ٤٨/٨ mg/mL پپتید Doogh containing 48.8 mg/mL peptide	4.00± 0.00 ^{A,b}	4.00± 0.00 ^{A,b}	4.00± 0.00 ^{A,a}	3.86± 0.18 ^{A,ab}

*وجود حداقل یک حرف لاتین بزرگ مشابه در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.
*وجود حداقل یک حرف لاتین کوچک مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.

جدول ٥- امتیازات رنگ نمونه‌های دوغ طی دوره نگهداری
Table 5- Color scores of doogh samples during storage

تیمارها Treatment	زمان نگهداری During Storage 1	20	40	60
دوغ شاهد (فاقد پپتید) Control sample	5.00± 0.00 A,a	5.00± 0.00 A,a	4.00± 0.00 B,b	4.00± 0.27 B,b
دوغ حاوی ۱۲/۲ mg/mL پپتید Doogh containing 12.2 mg/mL peptide	5.00± 0.00 A,a	4.86± 0.18 A,a	4.86± 0.18 A,a	4.14± 0.18 B,ab
دوغ حاوی ٢٤/٤ mg/mL پپتید Doogh containing 24.4 mg/mL peptide	5.00± 0.00 A,a	4.86± 0.18 AB,a	4.71± 0.24 B,a	4.14± 0.18 C,ab
دوغ حاوی ٤٨/٨ mg/mL پپتید Doogh containing 48.8 mg/mL peptide	5.00± 0.00 A,a	4.86± 0.18 AB,a	4.71± 0.24 B,a	4.43± 0.28 B,a

*وجود حداقل یک حرف لاتین بزرگ مشابه در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.
*وجود حداقل یک حرف لاتین کوچک مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.

جدول ٦- امتیازات بوی نمونه‌های دوغ طی دوره نگهداری
Table 6- Odor scores of doogh samples during storage

تیمارها Treatment	زمان نگهداری During Storage 1	20	40	60
دوغ شاهد (فاقد پپتید) Control sample	4.86± 0.18 A,a	4.14± 0.18 B,b	3.43± 0.28 C,b	3.00± 0.00 D,c
دوغ حاوی ۱۲/۲ mg/mL پپتید Doogh containing 12.2 mg/mL peptide	4.86± 0.18 A,a	4.71± 0.24 A,a	4.14± 0.18 B,a	3.71± 0.24 C,b
دوغ حاوی ٢٤/٤ mg/mL پپتید Doogh containing 24.4 mg/mL peptide	5.00± 0.00 A,a	4.71± 0.24 B,a	4.14± 0.18 C,a	4.00± 0.00 C,a
دوغ حاوی ٤٨/٨ mg/mL پپتید Doogh containing 48.8 mg/mL peptide	5.00± 0.00 A,a	4.86± 0.24 AB,a	4.57± 0.28 B,a	4.00± 0.00 C,a

*وجود حداقل یک حرف لاتین بزرگ مشابه در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.
*وجود حداقل یک حرف لاتین کوچک مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.

در روز اول تولید، نمونه شاهد و تیمارهای حاوی سطوح ۱۲/۲۰ و ۲۴/۴ mg/mL پپتید، امتیاز پذیرش کلی کامل را کسب کردند (۵/۰۰) و با افزایش سطح پپتید، امتیاز پذیرش کلی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (p<۰/۰۵)، به‌طوری که تیمار حاوی بالاترین سطح پپتید (۴۸/۸ mg/mL)، کمترین امتیاز پذیرش کلی را در روز اول داشت (۳/۵۷). در تیمار شاهد و تیمارهای حاوی سطوح ۱۲/۲۰ و ۲۴/۴ mg/mL پپتید، با گذشت زمان از روز اول تا ۶۰ نگهداری، میانگین امتیازات پذیرش کلی به تدریج کاهش یافت (p<۰/۰۵)، ولی در تیمارهای حاوی بالاترین سطح پپتید زیست‌فعال آب ماست، طی دوره نگهداری تغییر معنی‌داری در امتیاز پذیرش کلی مشاهده نگردید (p>۰/۰۵). در روز آخر انبارمانی، بالاترین امتیاز پذیرش کلی مربوط به تیمارهای حاوی ۲۴/۴ و ۴۸/۸ mg/mL پپتید بود (به‌ترتیب؛ ۴/۰۰ و ۴/۱۴) و تیمار شاهد کمترین امتیاز پذیرش کلی را داشت (۳/۰۰) (جدول ۷).

نتایج حاصل از ارزیابی ویژگی‌های حسی تیمارهای دوغ حاوی سطوح مختلف پپتید زیست‌فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های آب ماست نشان داد که در تیمار شاهد و تیمار حاوی پایین‌ترین سطح پپتید آب ماست (سطح ۱۲/۲۰ mg/mL)، طی دوره نگهداری ۶۰ روزه، امتیاز ویژگی‌های حسی مختلف نمونه‌های دوغ شامل بافت، مزه، رنگ، بو و پذیرش کلی کاهش یافت، ولی استفاده

از سطح بالاتر پپتید زیست‌فعال (۴۸/۸ mg/mL) حاصل از آب ماست سرعت اُفت ویژگی‌های حسی مختلف نمونه‌های دوغ را طی دوره انبارمانی به طور قابل توجهی کاهش داد، که این اثر احتمالاً در ارتباط با فعالیت‌های عملگرایی(فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی) پپتید زیست‌فعال آب ماست می‌باشد، که منجر به کاهش سرعت تغییرات خواص فیزیکوشیمیایی دوغها طی دوره انبارمانی شده و تولید محصولات فرعی حاصل از اکسیداسیون و رشد باکتریایی را به‌طور قابل توجهی کاهش می‌دهد. دلیل روند کاهش امتیازات حسی با گذشت زمان نگهداری می‌تواند به افزایش اسیدیته و کاهش pH در تیمارهای مختلف دوغ مرتبط باشد. محققین علت کاهش امتیاز عطر و طعم در نمونه‌های ماست در طی دوره نگهداری را افزایش اسیدیته و کاهش استالدئید بیان نموده‌اند (Guler-Akin and Serdar Akin, 2005). کاهش معنی‌دار امتیاز مزه و پذیرش کلی در تیمار حاوی بالاترین سطح پپتید زیست‌فعال ماست در روزهای اولیه انبارمانی مشاهده می‌شود، که احتمالاً به دلیل طعم نسبتاً تلخ پپتید در حجم بالا می‌باشد.

در مطالعه انجام شده توسط Farvin و همکاران (۲۰۱۰) گزارش گردید که افزودن پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی ماست دارای وزن مولکولی کمتر از ۱۰kDa به شیر غنی شده با روغن ماهی، تأثیر نامطلوب بر ویژگی‌های حسی نمونه‌ها نداشت (Farvin et al., 2010). با این حال، برخی محققین اظهار داشتند که هیدرولیزهای زیست‌فعال پروتئینی می‌توانند سبب ایجاد بدطعمی و مزه تلخ گردند (Moller *et al*., 2008). El-Sayed و همکاران (۲۰۱۴) به هیدرولیز کامل پروتئین‌های شیر توسط آنزیم تریپسین پرداخته (به‌طوری که هیچ باندی مشاهده نشد) و تأثیر پپتیدهای تولیدی بر خواص ارگانولپتیکی نوشیدنی عملگرای بر پایه توت‌فرنگی و انبه را مورد بررسی قرار دادند. این محققین دریافتند که استفاده از این پپتیدها در نمونه‌های نوشیدنی موجب ایجاد طعم تلخی گردید، که با استفاده از افزودن ساکارز، فروکتوز و سوکرالوز این تلخی را از بین بردند (El-Sayed et al., 2014). Won و همکاران (۲۰۱۷) اظهار داشتند که شرایط تولید هیدرولیزات‌های پروتئینی می‌تواند بر توسعه تلخی تأثیر داشته باشد. افزایش بیش از حد زمان هیدرولیز آنزیمی می‌تواند تلخی هیدرولیزات‌های تولیدی را افزایش دهد. دلیل تلخی اکثر هیدرولیزات‌های پروتئینی به حضور پپتیدهای آب‌گریز کوچک در هیدرولیزات‌های تولیدی نسبت داده شده است (Won et al., 2017).

جدول ۷- امتیازات پذیرش کلی نمونه‌های دوغ طی دوره نگهداری
Table 7- Overall acceptance scores of doogh samples during storage

تیمارها Treatment	زمان نگهداری During Storage 1	20	40	60
دوغ شاهد (فاقد پپتید) Control sample	5.00± 0.00 ^{A,a}	4.14± 0.18 ^{B,b}	3.57± 0.28 ^{C,b}	3.00± 0.00 ^{D,c}
دوغ حاوی ۱۲/۲ mg/mL پپتید Doogh containing 12.2 mg/mL peptide	5.00± 0.00 ^{A,a}	4.57± 0.28 ^{B,ab}	4.43± 0.28 ^{B,a}	3.57± 0.28 ^{C,b}
دوغ حاوی ٢٤/٤ mg/mL پپتید Doogh containing 24.4 mg/mL peptide	5.00± 0.00 ^{A,a}	4.71± 0.28 ^{B,a}	4.57± 0.28 ^{B,a}	4.00± 0.00 ^{C,a}
دوغ حاوی ٤٨/٨ mg/mL پپتید Doogh containing 48.8 mg/mL peptide	4.57± 0.28 ^{A,b}	4.57± 0.28 ^{A,ab}	4.14± 0.18 ^{A,a}	4.14± 0.18 ^{A,a}

*وجود حداقل یک حرف لاتین بزرگ مشابه در هر ردیف بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.

*وجود حداقل یک حرف لاتین کوچک مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر در سطح اطمینان ۵ درصد می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که پس از تلقیح باکتری‌های *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به فرمولاسیون دوغ، به دلیل شرایط اسیدی این محصول و همچنین در اثر فعالیت ضدباکتریایی پپتیدهای طبیعی موجود در دوغ و همچنین پپتید حاصل از آب ماست، شمارش این دو باکتری بیماری‌زا در کلیه تیمارهای دوغ به‌طور معنی‌داری کاهش یافت، به‌طوری‌که در نمونه شاهد در روز شصتم این باکتری‌ها یافت نشدند و تیمار حاوی بالاترین سطح پپتید زیست‌فعال آب ماست، در روز بیستم فاقد *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. طی دوره نگهداری ۶۰ روزه، مقادیر pH و قدرت مهار رادیکال کاتیونی

ABTS تیمارهای مختلف دوغ کاهش یافت، ولی میزان اسیدیته قابل تیتراسیون افزایش معنی‌داری (p<۰/۰۵) نشان داد. افزایش سطح پپتید زیست‌فعال آب ماست در فرمولاسیون دوغ موجب افزایش (p<۰/۰۵) فعالیت فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی نمونه‌های تولیدی شده و سرعت تغییرات pH و اسیدیته طی دوره نگهداری را به‌طور قابل توجهی کنترل کرد. نتایج ارزیابی حسی نشان داد که در نمونه شاهد (فاقد پپتید زیست فعال) و نمونه حاوی پایین‌ترین سطح پپتید (۱۲/۲۰ mg/mL)، امتیاز ویژگی‌های حسی طی دوره نگهداری کاهش یافت، ولی استفاده از بالاترین سطح پپتید آب ماست در فرمولاسیون دوغ توانست سرعت اُفت ویژگی‌های حسی را طی دوره نگهداری کاهش داده و کیفت محصول را حفظ نماید. در نهایت، با توجه به نتایج گزارش شده در این تحقیق، سطح ۴۸/۸ mg/mL پپتید زیست‌فعال آب ماست، به‌عنوان بهترین غلظت جهت غنی‌سازی دوغ تعیین گردید. بنابراین پپتید حاصل از هیدرولیز آنزیمی آب ماست می‌تواند به‌عنوان عامل آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی طبیعی در محصولات لبنی تخمیری مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. Adebayo, C. O., Aderiye, B. I. and Akpor, O. B. (2014). Assessment of bacterial and fungal spoilage of some Nigerian fermented and unfermented foods. *African Journal of Food Science*, 8(3): 140-147.
2. Agyei, D. and Danquah, M. K. (2012). Rethinking food- derived bioactivepeptides for antimicrobial and immunomodulatory activities. *Trends in Food Science and Technology*, 23(2): 62-69. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.010
3. Ahmadi, S. M., Moslehi Shad, M. and Rahimi, A. (2018). Investigation of antimicrobial activity of oleoresin essential oil on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Kluyveromyces marxianus and Penicillium* notatum and its effect on Iranian doogh shelf life. *Journal of Food Science and Technology*, 15, (85): 114-124 (in Persian).
4. Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave- Juchereau, S., Arnaudin, I., Gómez- Guillén, M. C. and Montero, P. (2011). Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*, 44: 1044-1051. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.010
5. Anonymous, (2006a). Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Milk and milk products- Determination of acidity and pH. National standard No. 2852 (in Persian).
6. Anonymous, (2006b). Institute of Standards and Industrial Research of Iran. The comprehensive method for enumeration of coagulase positive *Staphylococcus* sp. (*Staphylococcus aureus* and other species). National standard No. 6806-3 (in Persian).
7. Anonymous, (2008). Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Plain Doogh- Characteristics and test methods. National standard No. 2453 (in Persian).
8. Asoodeh, A., Memarpoor- Yazdi, M. and Chamani, J. (2012). Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from lysozyme hydrolysates. *Food Chemistry*, 131: 291-295. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.039
9. Athmani, N., Dehiba, F., Allaoui, A., Barkia, A., Bougatef, A. and Lamri-Senhadji, M. Y. (2015). *Sardina pilchardus* and *Sardinellaaurita* protein hydrolysates reduce cholesterolemia and oxidative stress in rat fed high cholesterol diet. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*, 5(1): 47-54.
10. Bachrouri, M., Quinto, E. J. and Mora, M. T. (2002). Survival of *Escherichia coli* O157: H7 during storage of yogurt at different temperatures. *Journal of Food Science*, 67(5): 1899-1903. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08743.x
11. Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K. and Nokihara, K. (1998). Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46: 49-53. https://doi.org/10.1021/jf970649w
12. Christopher, M. D., Reddy, V. P. and Venkateswarlu, K. (2009). Viability during storage of two *Bifidobacterium bifidum* strains in set and stirred yoghurts containing whey protein concentrate. *Natural Products*, 8: 25-31.
13. El Sayed, M. I., Awad, S., Wahba, A., El Attar, A. M. and Zeidan, M. (2014). Utilization of milk protein hydrolysate in functional beverages. *Alexandra Science Exchange Journal*, 35(1): 39-49. DOI: 10.21608/asejaiqjsae.2014.2572
14. Farvin, K. H. S., Baron, C. P., Nielsen, N. S. and Jacobsen, C. (2010). Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 1-in vitro assays and evaluation in ω-3 enriched milk. *Food Chemistry*, 123: 1081-1089. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.067
15. Gómez- Guillén, M. C., López-Caballero, M. E., López De Lacey, A., Alemán, A., Giménez, B. and Montero, P. (2010). Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. In: Bihan, E. L., Koueta, N. (Eds.), Sea By-Products as a Real Material: New Ways of Application. Transworld Research Network Signpost, Kerala, pp. 89-115.

16. Guler- Akin, B. and Serdar Akin, M. (2005). Effect of cysteine and different incubation temperatures on the microflora, chemical composition and sensory characteristic of bio-yoghurt made from goat's milk. *Food Chemistry*, 100: 788-793. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.038
17. Hancock, R. E. W. and Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Natural Biotechnology*, 24: 1551-1557. https://doi.org/10.1038/nbt1267
18. Harnedy, P. A. and Fitz Gerald, R. J. (2012). Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1): 6-24. https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.09.001
19. Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT-Food Science and Technology*, 39: 1221-1227. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.07.013
20. Korhonen, H.J. and Marnila, P. (2013). Milk bioactive proteins and peptides. In: Park,Y.W., Haenlein, G.F.W. (Eds.), Milk and Dairy Products in Human Nutrition. John Wiley & Sons, Oxford, pp. 148-171. https://doi.org/10.1002/9781118534168.ch8
21. Kumar, D., Chatli, M. K., Singh, R., Mehta, N. and Kumar, P. (2016). Effects of incorporation of camel milk casein hydrolysate on quality, oxidative and microbial stability of goat meat emulsion during refrigerated (4± 1◦C) storage. *Small Ruminant Research*, 144: 149-157. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.09.008
22. Ma, Y. S., Zhao, H. J. and Zhao, X. H. (2019). Comparison of the effects of the alcalase-hydrolysates of caseinate, and of fish and bovine gelatins on the acidification and textural features of set-style skimmed yogurt-type products. *Foods*, 8: 1-11. https://doi.org/10.3390/foods8100501
23. Miliauskas, G., Venskutonis, P. R. and Beek, T. A. V. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85: 231-237. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.05.007
24. Moller, N. P., Scholz- Ahrens, K. E., Roos, N. and Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47: 171-182. https://doi.org/10.1007/s00394-008-0710-2
25. Mora, L., Escudero, E., Fraser, P. D., Aristoy, M. C. and Toldrá, F. (2014a). Proteomic identification of antioxidant peptides from 400 to 2500 Da generated in Spanish dry-cured ham contained in a size-exclusion chromatography fraction. *Food Research International*, 56: 68-76. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.12.001
26. Mora, L., Reig, M. and Toldrá, F. (2014b). Bioactive peptides generated from meat industry by-products. *Food Research International*, 65: 334-349. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.014
27. Panesar, P. and Shinde, C. H. (2011). Effect of storage on synersis, pH, *Lactobacillus acidophilus* count, bifidobacterium count of *Aloe vera* fortified probiotic yoghurt. *Current Research in Dairy Science*, 11: 935-942.
28. Rao, S., Sun, J., Liu, Y., Zeng, H., Su, Y. and Yang, Y. (2012). ACE inhibitory peptides and antioxidant peptides derived from in vitro digestion hydrolysate of hen egg-white lysozyme. *Food Chemistry*, 135: 1245-1252. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.059
29. Saei-Dehkordi, S. S., Tajik, H., Moradi, M. and Khaleghi- Sigaroodi, F. (2010). Chemical composition of essential oils in *Zatoria multifloro* Biomass from different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6): 1562-1567. https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.03.025
30. Sah, B. N. P., Vasiljevic, T., McKechnie, S. and Donkor, O. N. (2016). Antibacterial and antiproliferative peptides in synbiotic yogurt- Release and stability during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, 99: 4233-4242. https://doi.org/10.3168/jds.2015-10499
31. Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N. and Juneja, L. R. (2004). Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in linoleic acid oxidation system. *Food Chemistry*, 86: 99-103. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.08.014
32. Salami, M., Yousefi, R., Ehsani, M. R., Dalgalarrondo, M., Chobert, J., Haertlé, T., Razavi, S.H., Saboury, A. A., Niasari- Naslaji, A. and Moosavi- Movahedi, A. A. (2008). Kinetic characterization of hydrolysis of camel and bovine milk proteins by pancreatic enzymes. *International Dairy Journal*, 18: 1097-1102. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.06.003
33. Salminen, S., Von Wright, A. and Ouwehand, A. (2004). Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. 3rd edition. Marcel Dekker Inc. New York.
34. Sampath Kumar, N., Nazeer, R. A. and Jaiganesh, R. (2011). Purification and bio-chemical characterization of antioxidant peptide from horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) viscera protein. *Peptides*, 32: 1496-1501. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.05.020
35. Sarmadi, B. H. and Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31: 1949-1956. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020
36. Shayesteh, F., Ahmad, A. and Usup, G. (2014). Bacteriocin production by a marine strain of *Bacillus* sp. Sh10: isolation, screening and optimization of culture condition. *Biotechnology*, 13: 273-281.

37. Singh, G., Kapoor, I. P. S. and Singh, P. (2011). Effect of volatile oil and oleoresin of anise on the shelf life of yogurt. *Journal of Food Process Preserve*, 35: 778-783. https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2011.00528.x
38. Taha, S., El Abd, M., De Gobba, C., Abdel- Hamid, M., Khalil, E. and Hassan, D. (2017). Antioxidant and antibacterial activities of bioactive peptides in buffalo’s yoghurt fermented with different starter cultures. *Food Science and Biotechnology*, 26(5): 1325-1332. https://doi.org/10.1007/s10068-017-0160-9
39. Tang, W., Zhang, H., Wang, L., Qian, H. and Qi X. (2015). Targeted separation of antibacterial peptidefrom protein hydrolysate of anchovy cooking waste water byequilibrium dialysis. *Food Chemistry*, 168: 115-123. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.027
40. Won, J. Y., Kim, H. S., Jang, J. A. and Kim, C. H. (2017). Functional properties of yogurt containing specific peptides derived from whey proteins. *Journal of Milk Science and Biotechnology*, 35(4): 249-254.
41. Zhuang, Y. and Sun, L. (2011). Preparation of reactive oxygen scavenging peptides from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin: optimization using response surface methodology. *Journal of Food Science*, 76: 483-489. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02108.x